

## APLICACIONES MÉDICAS DE LAS CÉLULAS PLURIPOTENTES INDUCIDAS PACIENTE-ESPECÍFICAS

ORIETTA BELTRÁN MD., MSc<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Militar Nueva Granada, Facultad de Medicina, Bogotá, Colombia, Genética Humana.

Correspondencia: [orietta.beltran@unimilitar.edu.co](mailto:orietta.beltran@unimilitar.edu.co)

Recibido: Enero 1 de 2013 Aceptado: Mayo 2 de 2013

### Resumen

Los recientes avances en la implementación de estrategias de reprogramación genética en células somáticas para la producción de células pluripotentes inducidas (iPS), abren la posibilidad de generar células pluripotentes para estudios del desarrollo embrionario y la diferenciación celular, herramientas para detección *in vitro* de nuevos medicamentos y evaluación de su eficacia y toxicidad, desarrollo de modelos *in vitro* de enfermedades humanas y uso en terapia celular. Las iPS, son células que muestran características fenotípicas y funcionales similares a las observadas en células madre embrionarias, sin los cuestionamientos éticos y legales de la manipulación de embriones. En particular, la generación de las células pluripotentes inducidas paciente-específicas ha permitido dilucidar los procesos fisiopatológicos de diversas enfermedades genéticas de etiología conocida y desconocida, así como plantean la posibilidad de realizar terapia celular autóloga y terapia génica basada en células para la regeneración tisular dependiendo de las necesidades individuales.

**Palabras clave:** Terapia celular, células pluripotentes paciente-específicas, reprogramación celular.

## MEDICAL APPLICATIONS OF INDUCED PLURIPOTENT CELLS SPECIFIC-PATIENT

### Abstract

Recent advances in the implementation of strategies of genetic reprogramming somatic cells to produce induced pluripotent cells (iPS), open the possibility of generating pluripotent cells for studies of embryonic development and cell differentiation, tools for *in vitro* detection of new drugs and evaluation of their efficacy and toxicity, in order to develop *in vitro* models of human disease and use in cell therapy. iPS cells are showing phenotypic and functional characteristics similar to those seen in embryonic stem cells, without the ethical and legal questionings of the experimental manipulation of embryos. In particular, generation of patient-specific pluripotent stem cells elucidate the pathophysiological processes of various genetic diseases of known and unknown aetiology, and raises the possibility of autologous cell therapy and cell-based gene therapy for tissue regeneration depending individual needs.

**Key words:** Disease modeling, cell therapy, patient-specific pluripotent stem cells, cell reprogramming.

## APLICAÇÕES MÉDICAS DAS CÉLULAS PLURIPOTENTES INDUZIDAS PACIENTE-ESPECÍFICAS

### Resumo

Os recentes avanços na implementação de estratégias de reprogramação genética em células somáticas para a produção de células pluripotentes induzidas (iPS), abrem a possibilidade de gerar células pluripotentes para estudos do desenvolvimento embrionário e a diferenciação celular, ferramentas para detecção *in vitro* de novos medicamentos e avaliação da sua eficácia e toxicidade, desenvolvimento de modelos *in vitro* de doenças humanas e uso em terapia celular. As iPS, são células que mostram características fenotípicas e funcionais similares às observadas em células tronco embrionárias, sem os questionamentos éticos e legais da manipulação de embriões. Em particular, a geração das células pluripotentes induzidas paciente-específicas tem permitido elucidar os processos fisiopatológicos de diversas doenças genéticas de etiologia conhecida e desconhecida, assim como estabelecem a possibilidade de realizar terapia celular autóloga e terapia gênica baseada em células para a regeneração tecidual dependendo das necessidades individuais.

**Palavras chave:** Terapia celular, células pluripotentes paciente-específicas, reprogramação celular.

### Introducción

Las dificultades éticas y legales con respecto al uso de embriones humanos para la obtención de células madre embrionarias, la capacidad de diferenciación limitada de las células madre adultas y el rechazo inmunológico de los trasplantes, planteó la necesidad de solucionar estos problemas con la generación directa de células pluripotentes a partir de células del propio paciente. La reciente identificación de factores inductores de pluripotencia ha ampliado el horizonte de la investigación básica del desarrollo embrionario y la diferenciación celular, así como de la investigación clínica de diversas patologías. La implementación de nuevas estrategias de reprogramación nuclear en células somáticas para la producción de células madre pluripotentes inducidas (iPS), abre la posibilidad de generar células pluripotentes paciente-específicas, útiles para la comprensión de los mecanismos fisiopatológicos de las enfermedades, la detección de medicamentos y la evaluación de su toxicidad (1-3). El objetivo de la presente revisión es dar a conocer las aplicaciones de las iPS paciente-específicas en el estudio de la enfermedad humana, con énfasis en las entidades de origen genético y describir las limitaciones técnicas más relevantes.

#### Células madre adultas y células madre embrionarias

Las células madre son un tipo de células indiferenciadas con capacidad de autorrenovación y de diferenciación

celular, que pueden producir células hijas comprometidas hacia una diferenciación terminal y células hijas con un fenotipo menos maduro o menos diferenciado mediante mecanismos de división celular asimétrica (4). Las células madre embrionarias constituyen la masa celular interna del blastocito y son pluripotentes, es decir, que poseen la capacidad de dar origen a todos los tipos celulares de un organismo (5). En un organismo adulto a nivel tisular ocurren procesos de renovación de células madre y producción de progenie diferenciada altamente coordinados, con el fin de suplir las diversas exigencias fisiológicas de los tejidos con respecto al requerimiento de células diferenciadas (4,6). De esta manera, las células madre adultas son capaces de autorrenovarse para lograr el mantenimiento de una reserva funcional en cada tejido adulto y de producir un número limitado de células diferenciadas hacia tipos celulares especializados del tejido del cual son originarias (7). Según su capacidad de diferenciación, las células madre adultas se clasifican en tres subtipos: células multipotentes que pueden dar origen a todos los tipos celulares de un tejido; células oligopotentes capaces de originar dos o más tipos celulares de un tejido y células unipotentes que pueden generar un único linaje (8). No obstante, la capacidad de diferenciación de las células madre adultas en esencia es restringida a linajes de su mismo origen germinal, constituyéndose en una desventaja para su uso terapéutico. En contraste, las células madre embrionarias humanas poseen una capacidad de proliferación indefinida y un mayor potencial de diferenciación, lo que dio lugar

a proponerlas como una fuente inagotable de células que podrían ser utilizadas en investigación básica o en terapia celular para tratar diversos tipos de enfermedades (5). Sin embargo, las consideraciones éticas y legales con respecto a la manipulación y destrucción de embriones humanos, así como el rechazo tisular después del trasplante, planteó la necesidad de solucionar estas dificultades con la generación de células pluripotentes directamente de células obtenidas del propio paciente (1-3).

### **Métodos de reprogramación nuclear y generación de células madre pluripotentes inducidas (iPS)**

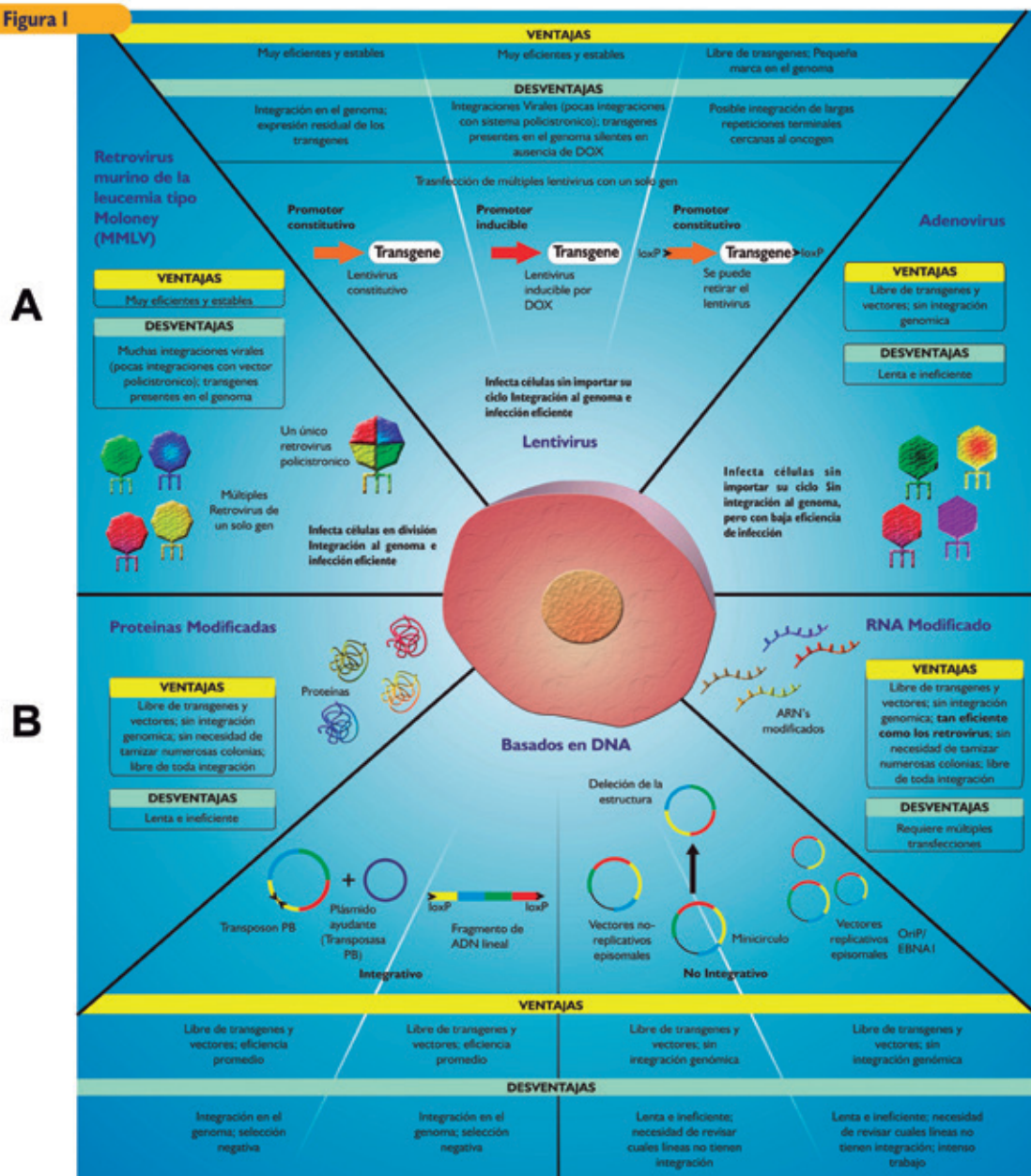
Las técnicas pioneras que se usaron en la reprogramación nuclear de células somáticas para la producción de células pluripotentes fueron: la transferencia nuclear somática (1,9,10), la fusión celular entre células somáticas y células madre embrionarias (11-13) y la inducción de células somáticas con extractos celulares derivados de células madre embrionarias (14,15). Inicialmente, con éstas tres técnicas se demostró que el genoma de una célula somática mantiene su capacidad de crear organismos viables y que el proceso de diferenciación es un proceso celular reversible, en el cual se producen cambios en la estructura de la cromatina regulados por factores que inducen la pluripotencia a las células con diferenciación terminal (16-18). Eran claros los indicios de que el citoplasma de oocitos no fecundados y de las células madre embrionarias contenían moléculas que conferirían pluripotencia a las células somáticas, planteando la hipótesis de que los factores que desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la identidad de células madre embrionarias, también debían tener un rol fundamental en la inducción de la pluripotencia en células somáticas (1,2,19,20). Las células reprogramadas mostraban modificaciones en su patrón de expresión génica global, evidenciando un silenciamiento específico de los genes del estado somático en todo el genoma y expresando genes típicos de células madre embrionarias como los genes Oct4, Nanog, TDGF1 y Rex1, involucrados en el mantenimiento de la pluripotencia y además mostraban cambios epigenéticos en el promotor de Oct4 (13,16,21-23). Bajo esta hipótesis, Shinya Yamanaka y colaboradores determinaron que la transducción de cuatro genes (Oct4, Sox, KLF4 y c-Myc) en fibroblastos de ratón adulto generaba células con características similares a las células madre embrionarias (2), las cuales denominaron células madre pluripotentes inducidas (iPS) y que estos mismos factores son requeridos en la ge-

neración de iPS humanas a partir de fibroblastos (24). Las iPS generadas mostraron características fenotípicas y funcionales muy similares a las de las células madre embrionarias, como la capacidad de diferenciación hacia tejidos de las tres capas germinales *in vitro* e *in vivo* (24-27). Sin embargo, una de las desventajas técnicas durante la generación de iPS, fue su eficiencia baja y que en promedio 20 transgenes retrovirales de los factores se integraron en el genoma de los fibroblastos reprogramados, lo cual podía aumentar el riesgo de formación de tumores (24,27). Ésto motivó a que diversos investigadores desarrollaran modificaciones en la técnica y permitió la implementación de diversos métodos de reprogramación nuclear no integrativos en el genoma con el fin de mejorar la seguridad en la generación de iPS (28-34). En la figura 1, se resumen algunos de los más recientes métodos de reprogramación nuclear, así como las ventajas y desventajas técnicas más relevantes.

### **Modelos fisiopatológicos a partir de células pluripotentes inducidas paciente-específicas**

Uno de los tópicos en la investigación clínica aplicada con iPS, es su obtención a partir de individuos que padecen una patología específica, utilizando células somáticas con diferenciación terminal, como fibroblastos, queratinocitos o leucocitos como tipo celulares para realizar la reprogramación nuclear, ofreciendo la oportunidad de obtención de células madre pluripotentes paciente-específicas (iPS paciente-específicas) ver figura 2 (3,24,27,35-40). Se ha planteado la generación de las iPS paciente-específicas que pueden facilitar el estudio de patologías donde el tiempo para la adaptación *in vitro* y la expansión del cultivo de células humanas primarias son muy limitados y en los que la falta de modelos de formación tisular normal y patológica frustra la investigación sobre la regulación de los procesos tisulares y hace inaccesible el entendimiento de la patogénesis (41,42). Adicionalmente, las iPS paciente-específicas pueden ser usadas en estudios para comprender la expresión variable del fenotipo, en donde los ensayos con cultivos de células humanas diferenciadas y con modelos animales no representan todos los aspectos de la fisiopatología humana, como ocurre en entidades de origen cromosómico, tan frecuentes como el síndrome de Down (41, 43-45). También, las iPS paciente-específicas han sido útiles en estudio de enfermedades genéticas con herencia monogénica y multifactorial (38,46), cuyos actuales modelos fisiopatológicos o terapéuticos son

Figura 1



**Figura 1. Métodos de reprogramación nuclear. (A) Métodos basados en vectores virales.** Diversos vectores virales muestran mayor eficiencia y estabilidad de la transfección, pero con integración al genoma. **(B) Métodos basados en DNA, proteínas y otras moléculas.** Los métodos basados en DNA poseen eficiencia intermedia pero algunos pueden integrarse al genoma; sin embargo, los RNA modificados muestran una eficiencia aceptable sin integración genómica y finalmente, las proteínas de los factores de reprogramación poseen eficiencia baja pero libre de transgenes y sin riesgo de integración genómica.

escasos y/o insuficientes (38,41,47,48). Todos estos estudios soportan que las iPSc paciente-específicas son útiles en el estudio mecanismos fisiopatológicos de las enfermedades, especialmente en patologías

de origen genético con una incidencia poblacional baja o muy baja (41). Dado los numerosos estudios que se han realizado, a continuación se describen algunos de los resultados más interesantes en el es-



tudio de modelos fisiopatológicos para enfermedades genéticas con iPS.

#### *Disautonomía Familiar*

Lee y colaboradores (49), en 2009 demostraron el modelamiento e identificación de nuevos medicamentos para la Disautonomía Familiar (FD), una enfermedad genética autosómica recesiva, muy rara con aproximadamente 600 casos descritos a nivel mundial, pero con una incidencia alta en la población judía. La FD afecta el sistema nervioso periférico, y es ocasionada en el 99.5% de los casos por una mutación puntual en el intrón 20 del gen *IKBKAP* que codifica la proteína asociada al complejo quinasa del inhibidor del factor nuclear  $\kappa B$  (I $\kappa$ B). La especificidad del compromiso en el sistema nervioso periférico y el mecanismo de pérdida neuronal eran mínimamente comprendidos por la ausencia de un modelo de estudio apropiado. Los autores lograron generar iPS paciente-específicas de FD y diferenciarlas a tejidos de las tres capas germinales y neuronas periféricas, con el fin de realizar análisis de la expresión génica y evidenciar la alteración tejido-específica *in vitro* del empalme alternativo de *IKBKAP*. Se observaron niveles de expresión de *IKBKAP* disminuidos en los precursores de la cresta neural paciente-específicos, sugiriendo un mecanismo patológico y evaluando por análisis transcripcional y experimentos celulares alteraciones en la diferenciación neurogénica y la migración. Además, se encontraron tres fenotipos relacionados con la FD. Finalmente, luego de la evaluación *in vitro* de diversos fármacos y compuestos se demostró que el fenotipo de FD podría ser parcialmente normalizado por la hormona cinetina (49,50).

#### *Atrofia Muscular Espinal*

La atrofia muscular espinal (SMA) es una entidad autosómica recesiva que produce degeneración de las motoneuronas inferiores, debida a mutaciones en el gen de supervivencia de motoneuronas 1 (*SMN1*), con una incidencia poblacional de 1 en 6.000, que cursa con una expresión clínica variable de severidad diversa (51,52). En humanos, existe el gen *SMN2*, el cual es un gen casi idéntico al *SMN1*, que produce un 10% de expresión de una proteína SMN inestable; sin embargo, los pacientes con fenotipo clínico de SMA menos severo, poseen múltiples copias del gen *SMN2*, y se ha planteado como un gen modificador

de la presentación clínica de la enfermedad (52,53). Los modelos de estudio de SMA se ha desarrollado en ratones, moscas y gusanos, haciendo evidente los mecanismos de muerte celular, pero con limitaciones importantes como la ausencia de *SMN2* en estas especies (54). Por otra parte, se han investigado medicamentos para activar la expresión de *SMN2* y modificar el curso de la enfermedad (52,55). Ante la necesidad de tener un modelo de estudio humano en el contexto neural, Ebert y colaboradores en el 2009 (56), produjeron iPS derivadas de un paciente con SMA tipo 1 y de su madre no afectada, demostrando su capacidad de diferenciación neuronal y a motoneuronas, con expresión de *SMN1* ausente y evidenciando el fenotipo de muerte selectiva de las motoneuronas y evaluando la respuesta terapéutica *in vitro* a ácido valproico y tobramicina, los cuales aumentan la expresión de la proteína SMN. Este estudio fue el primero en recapitular la fisiopatología de la SMA en un modelo humano, observando los efectos específicos de la patología y en la evaluación del incremento de expresión de la proteína SMN inducida por medicamentos.

#### *Adrenoleucodistrofia ligada al X*

La adrenoleucodistrofia ligada al X (X-ALD), es una enfermedad peroxisomal que produce un incremento en los niveles de ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFA) y que compromete la sustancia blanca del sistema nervioso y la función adrenocortical en hombres (57). La prevalencia de la X-ALD se ha estimado entre 1 en 20.000 a 1 en 50.000. La X-ALD es ocasionada por mutaciones en el gen *ABCD1*, cuya fisiopatología no ha sido claramente entendida (57,58). En el 2011, Jang y colaboradores (58), generaron iPS derivadas de pacientes con dos de las principales formas clínicas de X-ALD; la adrenoleucodistrofia cerebral infantil (CCALD) y la adrenomieloneuropatía (AMN), logrando obtener oligodendrocitos y evidenciando una acumulación significativamente alta de ácidos grasos de cadena muy larga en los oligodendrocitos derivados de iPS de CCALD y en un rango menor acumulación en los oligodendrocitos de iPS de AMN. No se evidenciaron diferencias en la acumulación de ácidos grasos de cadena muy larga en las neuronas, lo cual evidencia que las manifestaciones clínicas severas de la CCALD están asociadas con la acumulación específica de VLCFA en oligodendrocitos y que puede ser disminuida con el tratamiento de lovastatina o fenilbutirato a través de la regulación positiva de la expresión génica del gen *ABCD2* (58,59).

### Disqueratosis congénita

La disqueratosis congénita (DC), es una enfermedad por alteración en el mantenimiento telomérico, con compromiso en diversos sistemas, principalmente piel, mucosa, médula ósea y pulmón. La DC tiene una expresión clínica muy variable y se ha demostrado heterogeneidad de locus con modos de herencia autosómica dominante, autosómico recesivo y ligado al X recesivo (60,61). En el 2011, Batista y colaboradores (61), demostraron que las iPS de pacientes con tipos diferentes de DC muestran las alteraciones bioquímicas particulares de cada forma y que la alteración en el mantenimiento de la integridad de los telómeros se correlaciona con la severidad clínica. En las iPS de pacientes con mutación heterocigota en TERT, se reducen a la mitad los niveles de telomerasa y se interfiere en la elongación telomérica inherente a la reprogramación nuclear. La mutación del gen DKC1 limita la actividad de la telomerasa por inhibición e interrumpe la elongación telomérica durante la reprogramación. Las iPS con mutación en TCAB1, producen alteración de la localización nuclear de la enzima telomerasa. Adicionalmente, los autores realizaron cultivos a largo plazo de iPS derivadas de pacientes con DC por mutación en DKC1 observando un acortamiento telomérico y una pérdida de la capacidad de autorenovación de las iPS paciente-específicas de DKC1, sugiriendo que eventos similares ocurren en las células madre de los pacientes con DC.

### Síndrome de Marfan

El síndrome de Marfan (MFS) es una enfermedad hereditaria del tejido conectivo, con patrón de herencia autosómica dominante, ocasionada por mutaciones en el gen de la proteína de la matriz extracelular, fibrilina1, codificada por el gen FBN1, que produce compromiso ocular, esquelético y cardiovascular (62,63). En 2012, Quarto y colaboradores (64), estudiaron los perfiles fenotípicos esqueléticos de tejidos diferenciados de células madre embrionarias y de iPS con mutación en el gen FBN1, demostrando que la diferenciación osteogénica es inhibida en MFS por activación de la vía de señalización TGF- $\beta$ . Además, demostraron que la inhibición *in vitro* de la vía TGF- $\beta$ , rescata la diferenciación osteogénica en células de MFS.

Los estudios anteriores demuestran el uso de las iPS paciente-específicas para el estudio de modelos fisiopatológicos que han permitido la derivación de tipos

de celulares relevantes para evaluar síntomas, identificar la etiología de enfermedades, evaluar fármacos candidatos para revertir *in vitro* el fenotipo y realizar estudios sobre los mecanismos patológicos, ver figura 2 (38-41). Sin embargo, a pesar de que las iPS paciente-específicas se han generado para estudios en múltiples patologías, algunos investigadores han reportado en algunas enfermedades que no se han evidenciado las alteraciones patológicas características, como ha ocurrido con la generación de iPS paciente-específicas de esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (65), distrofia muscular de Duchenne (41) y corea de Huntington (66,67). Por ejemplo, en la corea de Huntington, enfermedad neurodegenerativa causada por la expansión anormal de repeticiones de la tripleta CAG en el gen HTT que codifica la proteína huntingtina (68), el grupo de Juopperi y colaboradores (67), generaron iPS derivadas en un paciente de corea de Huntington tipo adulto con 50 repeticiones CAG y de su hija con corea de Huntington tipo juvenil que tenía 109 repeticiones CAG, evaluando la diferenciación neuronal y astrocítica *in vitro* observaron en el citoplasma de astrocitos de ambas líneas celulares vacuolas citoplasmáticas particularmente, más pronunciadas en astrocitos derivados de las iPS de corea de Huntington tipo juvenil. Adicionalmente, Chae y colaboradores en el 2012 (69), realizaron un análisis proteómico cuantitativo de líneas celulares derivadas de iPS de un paciente con corea de Huntington que tenía 72 repeticiones CAG, observando disminución de la expresión de proteínas relacionadas con la respuesta al estrés oxidativo y sobreexpresión de proteínas apoptóticas. No obstante, no se ha recapitulizado por completo el mecanismo fisiopatológico claro de la alteración selectiva de las neuronas GABAérgicas de los núcleos basales, típicamente observados en los cerebros de pacientes con corea de Huntington.

Es evidente que existen dificultades técnicas que se ha de superar en la aplicación de las iPS para el modelamiento de patologías, en especial en enfermedades con un período de latencia largo con ocurre en ELA, corea de Huntington, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson (70,71). En estas patologías la dinámica de la progresión de la enfermedad probablemente difiera del desarrollo *in vitro* de células diferenciadas a partir de iPS paciente-específicas (70). Otra de las limitaciones es el estudio de patogénesis con un solo tipo de células purificadas dadas las diversas interacciones célula-célula y célula con el microambiente tisular que deben ser reconstruidos sistemáticamente, así como en algunos

casos no han sido claramente establecidos los protocolos de diferenciación particulares (70,71). Adicionalmente, las patologías con componente epigenético tendrían dificultades para ser estudiadas a través de iPS, debido a que durante el proceso de reprogramación nuclear se presentan modificaciones epigenéticas (72,73) que probablemente afecten el fenotipo de estas patologías, como ocurre en entidades sindrómicas por epimutaciones, trastornos esporádicos y en las enfermedades comunes de origen multifactorial (38,70). Sin embargo, dependiendo de la técnica de reprogramación nuclear utilizada, se ha observado que se conserva en menor o mayor grado la memoria epigénica de la célula somática reprogramada (74).

Por otra parte, para establecer un modelo general de la enfermedad, se requiere utilizar un panel de líneas derivadas del mismo paciente, así como de los pacientes no relacionados adicionales, que deben ser comparados para asegurar que las observaciones no son específicas de una línea celular dada, o de un paciente en particular (70,71). Adicionalmente, dada la diversidad genética de fondo que existe entre individuos no relacionados, el uso de células “control” sanas de líneas derivadas de hermanos no afectados, puede disminuir el ruido de fondo de los resultados durante las comparaciones experimentales. Otra consideración, es que en las enfermedades con mutaciones somáticas adquiridas, líneas de iPS aisladas a partir de tipos de células no afectadas, podrían ser utilizados como controles. Finalmente, en las enfermedades monogénicas líneas de iPS corregidas genéticamente podría representar un control isogénico ideal (70,75).

### Terapia celular y terapia génica basada en iPS

Adicionalmente a los estudios de patogénesis, las iPS paciente-específicas pueden utilizarse para realizar corrección de alteraciones genéticas *ex vivo* y luego ser diferenciadas en los tipos celulares requeridos para un tratamiento personalizado, ver figura 2 (39,75,76).

Los estudios experimentales en ratones, han demostrado el uso de iPS para terapia celular generando células madre hematopoyéticas en un ratón “humanizado” con anemia de células falciforme (77), iPS derivadas en progenitor endotelial en el hígado de ratón con hemofilia A con aumento en la supervivencia y aumentando los niveles de factor VIII (78), o iPS a partir de fibroblastos para generar neuronas dopaminérgicas y restablecer la función en ratas con Parkinson (79). Por

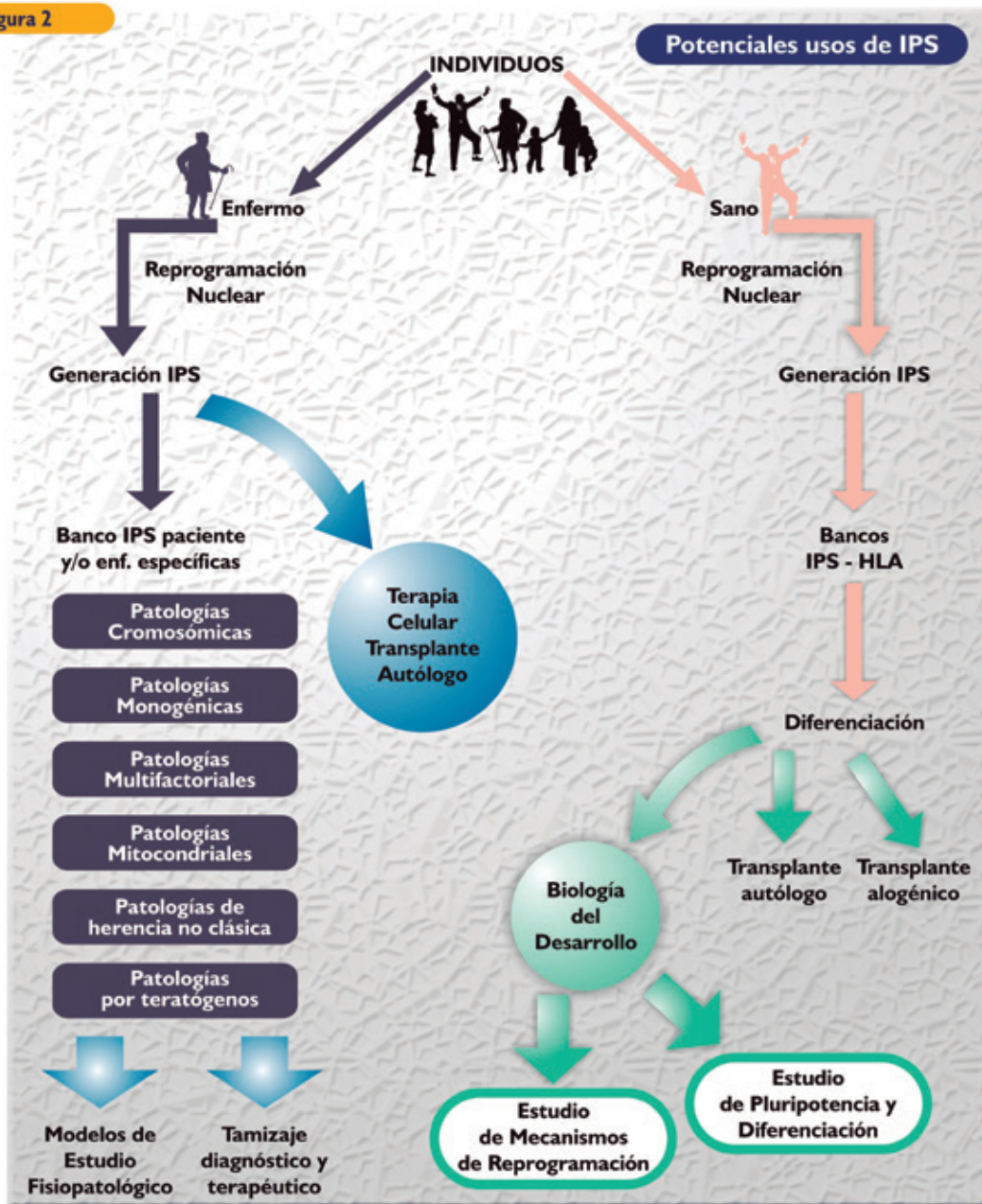
otra parte, Raya y colaboradores (80,81) publicaron en el 2009, un estudio de corrección de la alteración genética en células somáticas de pacientes con anemia de Fanconi que fueron reprogramadas para generar iPS paciente-específicas. Las iPS paciente-específicas corregidas fueron diferenciadas a linajes hematopoyéticos dando origen a células progenitoras de línea mieloide y eritroide normales. Otro estudio similar se ha informado en errores innatos del metabolismo por Tolar y colaboradores (82), donde generaron iPS de un paciente con mucopolisacaridosis tipo I a partir de células de la piel y del estroma de la médula ósea. Los autores evidenciaron acumulación significativa de glucosaminoglicanos en las iPS paciente-específicas de mucopolisacaridosis tipo I, las cuales posteriormente fueron tratadas *in vitro* con lentivirus que contenían el gen IDUA normal recuperando el fenotipo celular normal.

### Conclusiones y perspectivas

Una de las aplicaciones de las células iPS más interesantes en la medicina actual, es su uso en el desarrollo de estudios de modelos fisiopatológicos de múltiples patologías, lo que demuestra la gran influencia de esta tecnología en la investigación clínica (39,66,83). Existen varios estudios que demuestran que las células iPS paciente-específicas corregidas, pueden facilitar una plataforma para comprender la expresividad variable de la severidad clínica de una patología, generar pruebas de predicción con el fin de determinar diferencias en la manifestación clínica de la enfermedad y el descubrimiento de compuestos terapéuticos (39,40,66,84). De hecho, la generación de iPS paciente-específicas se ha vuelto una técnica frecuentemente realizada en diversos centros de investigación, facilitando la comprensión de los mecanismos fisiopatológicos de las enfermedades y la evaluación de nuevos medicamentos (39,85,86). En comparación con los estudios de células diferenciadas humanas y con los modelos animales de enfermedades, los estudios de células iPS paciente-específicas tienen la ventaja de ofrecer un análisis más amplio de los efectos celulares de la deficiencia del producto proteico del gen mutado, y en particular en los errores innatos del metabolismo evaluar la deficiencia enzimática independiente de los efectos secundarios, como la respuesta inflamatoria sistémica que cursan algunas de estas patologías (39,82). Por otra parte, dado el carácter pluripotente inherente de las iPS, virtualmente es posible obtener casi todos los tipos celulares a partir de las células iPS.



Figura 2



**Figura 2. Usos potenciales de las células pluripotentes inducidas (iPS).** Las iPS de individuos sanos pueden ser utilizadas para obtención de células (o tejidos) de las tres líneas germinales, estudios de biología del desarrollo y creación de bancos de células para terapia autóloga o alogénica. Las iPS de pacientes sirven para el estudio de modelos fisiopatológicos, estudios de tamizajes de diagnóstico y/o de terapéutica, e incluso terapia celular autóloga posterior a corrección génica ex vivo.

Adicionalmente las iPS paciente-específicas poseen una gran ventaja sobre los modelos animales, por las diferencias obvias en el desarrollo de cada especie y las consecuencias de la patología celular en los diversos tejidos afectados (39).

Adicionalmente, la generación iPS de individuos sanos e iPS paciente-específicas pueden tener una amplia gama de aplicaciones en la terapia celular y génica, y podrían ser particularmente útiles para el tratamiento de síndromes hereditarios que cursan con falla de la médula ósea, en



los cuales la disminución progresiva de las células madre hematopoyéticas (HSC), restringe la producción de células sanguíneas periféricas y donde el tratamiento de primera elección es el trasplante de HSC de hermanos idénticos, seguido del trasplante de HSC con donante no relacionado (80,81,87-89). De tal manera, es importante la creación de bancos de células somáticas sanas y de células de pacientes que podrán ser utilizados para la generación de células pluripotentes con diversos propósitos investigativos y terapéuticos, ver figura 2.

El potencial uso de derivados de iPS en la terapia humana, requiere evaluar su seguridad clínica, en donde se debe vigilar aspectos como la estabilidad cromosómica con citogenética convencional y molecular de las células para detectar anomalías cromosómicas que pueden surgir durante el cultivo celular prolongado (90). Además, la implementación de métodos de reprogramación nuclear libres de vectores con integración genómica y cultivos celulares libres de xenobióticos que deberán ser un requisito reglamentario para esta clase de terapias basadas en células (34,70). Es probable que una vez superadas las evaluaciones de seguridad y toxicidad de las iPS paciente-específicas corregidas, se podrían utilizar para la generación de tipos celulares de los sitios sistemas y/o tejidos a tratar. Finalmente, si las células iPS demuestran ser lo suficientemente seguras podrían ser utilizadas para terapia celular (25,30,34). En la actualidad, el reto de los investigadores en el campo de la medicina regenerativa es incrementar la eficiencia y seguridad de las técnicas de reprogramación nuclear para la aplicación clínica de las iPS.

## Agradecimientos

A la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad Militar Nueva Granada por la financiación del proyecto Med573, a los integrantes de la línea de profundización de Células Madre y Medicina Regenerativa de la Facultad de Medicina de la Universidad Militar Nueva Granada y a Jorge Patiño Ospina de la División de Recursos Educativos de la Universidad Militar Nueva Granada por su ayuda en el diseño de las figuras.

## Referencias

- Gurdon JB, Byrne JA, Simonsson S. Nuclear reprogramming and stem cell creation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(1): 11819-22.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126(4): 663-76.
- Nishikawa S, Goldstein RA, Nierras CR. The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; 9(9): 725-9.
- Hall PA, Watt FM. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development*. 1989; 106(4): 619-33.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998; 282(5391): 1145-7.
- Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development*. 1990; 110(4): 1001-20.
- Beltrán O, Quintero L, Chaparro O. Plasticidad y transdiferenciación en células "stem" adultas – Revisión. *Revista Med*. 2005; 13(1): 10-16.
- Smith A. A glossary for stem-cell biology. *Nature*. 2006; (441): 1060.
- Gurdon JB. Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Dev Biol*. 1962; 4: 256-73.
- Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*. 1996; 380(6569): 64-6.
- Tada M, Tada T, Lefebvre L, Barton SC, Surani MA. Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somatic nucleus in hybrid cells. *EMBO J*. 1997; 16(21): 6510-20.
- Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N, Tada T. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol*. 2001; 11(19): 1553-8.
- Cowan CA, Atienza J, Melton DA, Eggan K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science*. 2005; 309(5739): 1369-73.
- Qin M, Tai G, Collas P, Polak JM, Bishop AE. Cell extract-derived differentiation of embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2005; 23(6): 712-8.
- Taranger CK, Noer A, Sørensen AL, Håkelién AM, Boquest AC, Collas P. Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells. *Mol Biol Cell*. 2005; 16(12): 5719-35.
- Tada T, Tada M. Toti-/pluripotent stem cells and epigenetic modifications. *Cell Struct Funct*. 2001; 26(3): 149-60.
- Wilmut I, Beaujean N, de Sousa PA, Dinnyes A, King TJ, Paterson LA, Wells DN, Young LE. Somatic cell nuclear transfer. *Nature*. 2002; 419(6907): 583-6.
- Gurdon JB, Byrne JA. The first half-century of nuclear transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(14): 8048-52.
- Hochedlinger K, Jaenisch R. Nuclear reprogramming and pluripotency. *Nature*. 2006; 441(7097): 1061-7.
- Mitalipov S, Wolf D. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2009; 114:185-99.
- Byrne JA, Simonsson S, Western PS, Gurdon JB. Nuclei of adult mammalian somatic cells are directly reprogrammed to oct-4 stem cell gene expression by amphibian oocytes. *Curr Biol*. 2003; 13(14): 1206-13.
- Simonsson S, Gurdon J. DNA demethylation is necessary for the epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei. *Nat Cell Biol*. 2004; 6(10): 984-90.
- Hajkova P, Ancelin K, Waldmann T, Lacoste N, Lange UC, Cesari F, et al. Chromatin dynamics during epigenetic reprogramming in the mouse germ line. *Nature*. 2008; 452(7189): 877-81.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007; 131(5): 861-72.
- Yamanaka S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2007; 1(1): 39-49.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007; 318(5858): 1917-20.

27. Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc.* 2007; 2(12): 3081-9.
28. Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science.* 2008; 322(5903): 949-53.
29. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol.* 2008; 26(1): 101-6.
30. Maherali N, Hochedlinger K. Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2008; 3(6): 595-605.
31. Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science.* 2008; 322(5903): 945-9.
32. Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P, Woltjen K. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature.* 2009; 458(7239): 771-5.
33. Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell stem cell.* 2009; 4(6): 472-6.
34. González F, Boué S, Izpisua Belmonte JC. Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming à la carte. *Nat Rev Genet.* 2011; 12(4): 231-42.
35. Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, Carey BW, Beard C, Wernig M, et al. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell.* 2008; 133(2): 250-64. Erratum in: *Cell.* 2008; 134(2):365.
36. Müller R, Lengerke C. Patient-specific pluripotent stem cells: promises and challenges. *Nat Rev Endocrinol.* 2009; 5(4): 195-203.
37. Ensenat-Waser R, Pellicer A, Simon C. Reprogrammed induced pluripotent stem cells: how suitable could they be in reproductive medicine? *Fertil Steril.* 2009; 91(4): 971-4.
38. Zhu H, Lensch MW, Cahan P, Daley GQ. Investigating monogenic and complex diseases with pluripotent stem cells. *Nat Rev Genet.* 2011; 12(4): 266-75.
39. Robinton DA, Daley GQ. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature.* 2012; 481(7381): 295-305.
40. Soldner F, Jaenisch R. Medicine. iPSC disease modeling. *Science.* 2012; 338(6111): 1155-6.
41. Park IH, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell.* 2008; 134(5): 877-86.
42. Park IH, Lerou PH, Zhao R, Huo H, Daley GQ. Generation of human-induced pluripotent stem cells. *Nat Protoc.* 2008; 3(7): 1180-6.
43. Mou X, Wu Y, Cao H, Meng Q, Wang Q, Sun C, et al. Generation of disease-specific induced pluripotent stem cells from patients with different karyotypes of Down syndrome. *Stem Cell Res Ther.* 2012; 3(2): 14.
44. Maclean GA, Menne TF, Guo G, Sanchez DJ, Park IH, Daley GQ, Orkin SH. Altered hematopoiesis in trisomy 21 as revealed through in vitro differentiation of isogenic human pluripotent cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109(43): 17567-72.
45. Li LB, Chang KH, Wang PR, Hirata RK, Papayannopoulou T, Russell DW. Trisomy correction in Down syndrome induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2012; 11(5): 615-9.
46. Jang J, Yoo JE, Lee JA, Lee DR, Kim JY, Huh YJ, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells: a platform for human disease modeling and drug discovery. *Exp Mol Med.* 2012; 44(3): 202-13.
47. Pfannkuche K, Hannes T, Khalil M, Noghabi MS, Morshedi A, Hescheler J, et al. Induced pluripotent stem cells: a new approach for physiological research. *Cell Physiol Biochem.* 2010; 26(2): 105-24.
48. Unternaehrer JJ, Daley GQ. Induced pluripotent stem cells for modelling human diseases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2011; 366(1575): 2274-85.
49. Lee G, Papapetrou EP, Kim H, Chambers SM, Tomishima MJ, Fasano CA, et al. Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature.* 2009; 461(7262):402-6.
50. Lee G, Studer L. Modelling familial dysautonomia in human induced pluripotent stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2011; 366(1575): 2286-96.
51. Crawford TO, Pardo CA. The neurobiology of childhood spinal muscular atrophy. *Neurobiol Dis.* 1996; 3(2): 97-110.
52. Xiao J, Maragan JJ, Zheng W, Titus S, Southall N, Cherry JJ, et al. Discovery, synthesis, and biological evaluation of novel SMN protein modulators. *J Med Chem.* 2011; 54(18): 6215-33.
53. Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B. A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96(11): 6307-11.
54. Schmid A, DiDonato CJ. Animal models of spinal muscular atrophy. *J Child Neurol.* 2007; 22(8): 1004-12.
55. Kostova FV, Williams VC, Heemskerk J, Iannaccone S, DiDonato C, Swoboda K, et al. Spinal muscular atrophy: classification, diagnosis, management, pathogenesis, and future research directions. *J Child Neurol.* 2007; 22(8): 926-45.
56. Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr, Mattis VB, Lorson CL, Thomson JA, et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature.* 2009; 457(7227): 277-80.
57. Kemp S, Pujol A, Waterham HR, van Geel BM, Boehm CD, Raymond GV, et al. ABCD1 mutations and the X-linked adrenoleukodystrophy mutation database: role in diagnosis and clinical correlations. *Hum Mutat.* 2001; 18(6): 499-515.
58. Jang J, Kang HC, Kim HS, Kim JY, Huh YJ, Kim DS, et al. Induced pluripotent stem cell models from X-linked adrenoleukodystrophy patients. *Ann Neurol.* 2011; 70(3): 402-9.
59. Wang XM, Yik WY, Zhang P, Lu W, Dranchak PK, Shibata D, et al. The gene expression profiles of induced pluripotent stem cells from individuals with childhood cerebral adrenoleukodystrophy are consistent with proposed mechanisms of pathogenesis. *Stem Cell Res Ther.* 2012; 3(5): 39.
60. Agarwal S, Loh YH, McLoughlin EM, Huang J, Park IH, Miller JD, et al. Telomere elongation in induced pluripotent stem cells from dyskeratosis congenita patients. *Nature.* 2010; 464(7286): 292-6.
61. Batista LF, Pech MF, Zhong FL, Nguyen HN, Xie KT, Zaug AJ, et al. Telomere shortening and loss of self-renewal in dyskeratosis congenita induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2011; 474(7351): 399-402.
62. Dean JC. Marfan syndrome: clinical diagnosis and management. *Eur J Hum Genet.* 2007; 15(7): 724-33.
63. Aalberts JJ, Thio CH, Schuurman AG, van Langen IM, van der Pol BA, van Tintelen JP, van den Berg MP. Diagnostic yield in adults screened at the Marfan outpatient clinic using the 1996 and 2010 Ghent nosologies. *Am J Med Genet A.* 2012; 158A(5): 982-8.
64. Quarto N, Leonard B, Li S, Marchand M, Anderson E, Behr B, et al. Skeletogenic phenotype of human Marfan embryonic stem cells faithfully phenocopied by patient-specific induced-pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109(1): 215-20.
65. Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, et al. Induced pluripotent stem cells generated

- from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*. 2008; 321(5893): 1218-21.
66. Ming GL, Brüstle O, Muotri A, Studer L, Wernig M, Christian KM. Cellular reprogramming: recent advances in modeling neurological diseases. *J Neurosci*. 2011; 31(45): 16070-5.
  67. Juopperi TA, Kim WR, Chiang CH, Yu H, Margolis RL, Ross CA, et al. Astrocytes generated from patient induced pluripotent stem cells recapitulate features of Huntington's disease patient cells. *Mol Brain*. 2012; 5: 17.
  68. Walker FO. Huntington's disease. *Lancet*. 2007; 369(9557): 218-28.
  69. Chae JI, Kim DW, Lee N, Jeon YJ, Jeon I, Kwon J, et al. Quantitative proteomic analysis of induced pluripotent stem cells derived from a human Huntington's disease patient. *Biochem J*. 2012; 446(3): 359-71.
  70. Saha K, Jaenisch R. Technical challenges in using human induced pluripotent stem cells to model disease. *Cell Stem Cell*. 2009; 5(6): 584-95.
  71. Hanna JH, Saha K, Jaenisch R. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell*. 2010; 143(4): 508-25.
  72. Jaenisch R, Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*. 2008; 132(4): 567-82.
  73. Hochedlinger K, Plath K. Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development*. 2009; 136(4): 509-23.
  74. Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan P, et al. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2010; 467(7313): 285-90.
  75. Sun N, Longaker MT, Wu JC. Human iPS cell-based therapy: considerations before clinical applications. *Cell Cycle*. 2010; 9(5): 880-5.
  76. Chun YS, Byun K, Lee B. Induced pluripotent stem cells and personalized medicine: current progress and future perspectives. *Anat Cell Biol*. 2011; 44(4): 245-55.
  77. Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Casady JP, et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*. 2007; 318: 1920-1923.
  78. Xu D, Alipio Z, Fink LM, Adcock DM, Yang J, Ward DC, et al. Phenotypic correction of murine hemophilia A using an iPS cell-based therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106: 808-813.
  79. Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, et al. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105: 5856-5861.
  80. Raya A, Rodríguez-Pizà I, Guenechea G, Vassena R, Navarro S, Barrero MJ, et al. Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2009; 460(7251): 53-9.
  81. Müller LU, Milsom MD, Harris CE, Vyas R, Brumme KM, Parmar K, et al. Overcoming reprogramming resistance of Fanconi anemia cells. *Blood*. 2012; 119(23): 5449-57.
  82. Tolar J, Park IH, Xia L, Lees CJ, Peacock B, Webber B, et al. Hematopoietic differentiation of induced pluripotent stem cells from patients with mucopolysaccharidosis type I (Hurler syndrome). *Blood*. 2011; 117(3): 839-47.
  83. Singh R, Shen W, Kuai D, Martin JM, Guo X, Smith MA, et al. iPS cell modeling of Best disease: insights into the pathophysiology of an inherited macular degeneration. *Hum Mol Genet*. 2012 Nov 12. [Epub ahead of print]
  84. Bilican B, Serio A, Barmada SJ, Nishimura AL, Sullivan GJ, Carrasco M, et al. Mutant induced pluripotent stem cell lines recapitulate aspects of TDP-43 proteinopathies and reveal cell-specific vulnerability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109(15): 5803-8.
  85. Rowntree RK, McNeish JD. Induced pluripotent stem cells: opportunities as research and development tools in 21st century drug discovery. *Regen Med*. 2010; 5(4): 557-68.
  86. Deshmukh RS, Kovács KA, Dinnyés A. Drug discovery models and toxicity testing using embryonic and induced pluripotent stem-cell-derived cardiac and neuronal cells. *Stem Cells Int*. 2012; 379569. Epub 2012 May 8.
  87. Lengerke C, Grauer M, Niebuhr NI, Riedt T, Kanz L, Park IH, Daley GQ. Hematopoietic development from human induced pluripotent stem cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2009; 1176: 219-27.
  88. Peters A, Burridge PW, Pryzhkova MV, Levine MA, Park TS, Roxbury C, et al. Challenges and strategies for generating therapeutic patient-specific hemangioblasts and hematopoietic stem cells from human pluripotent stem cells. *Int J Dev Biol*. 2010; 54(6-7): 965-90.
  89. Pessach IM, Ordovas-Montanes J, Zhang SY, Casanova JL, Giliani S, Gennery AR, et al. Induced pluripotent stem cells: a novel frontier in the study of human primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol*. 2011; 127(6): 1400-7.
  90. Spits C, Mateizel I, Geens M, Mertzaniadou A, Staessen C, Vandeskelde Y, et al. Recurrent chromosomal abnormalities in human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*. 2008; 26:1361-1363.